

Aus dem Hygiene Institut der Universität Basel
(Direktor: Prof. Dr. J. Tomcsik)

Serologische Untersuchungen an Staphylokokken

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Dieter Vischer

von Basel

1958

Basel 1959



VERLAG VON S. KARGER IN BASEL

Von der Medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag von Prof. Dr.
J. Tomcsik.

Tag der Promotion: 4. Juli 1958

Sonderdruck aus der «Schweizerischen Zeitschrift für Allgemeine Pathologie
und Bakteriologie» Vol. 22, No. 1, 1959

Serologische Untersuchungen an Staphylokokken*.

* Für diese Arbeit stand ein Beitrag der Hans Buess-Stiftung zur Verfügung.



Die ersten serologischen Untersuchungen an Staphylokokken dienten dem Zwecke, eine Methode zur Differenzierung pathogener und apathogener Keime zu finden. *Kolle* und *Otto* (1902) stellten durch intraperitoneale Injektion abgetöteter Agarkulturen an Kaninchen Immunsereen her, mit denen es gelang, nach ihrer Herkunft als pyogen oder saprophytisch aufzufassende Staphylokokken auf Grund der Agglutination im Reagenzglas zu unterscheiden. Bei Umgebungsuntersuchungen isolierte Keime konnten so auf ihre Bedeutung geprüft werden. In den folgenden Jahren wurden diese Resultate von mehreren Autoren bestätigt (*Otto*, 1903; *Pröscher*, 1903; *Veiel*, 1904; *Klopstock* und *Bockenheimer*, 1904; *Kutscher* und *Konrich*, 1904; *Klein*, 1912; *Geisse*, 1914). Zu weniger eindeutigen Ergebnissen kamen *Altmann* und *Blühdorn* (1911), *Hudson* (1923), *Hegemann* (1937) und *Böe* (1944). Für die Widersprüche in den Resultaten dürften zum Teil Unterschiede in der Technik verantwortlich sein, vor allem aber der Umstand, daß von den einzelnen Autoren ganz andere Kriterien der Pathogenität angenommen wurden.

Hine (1922) versuchte, unter 90 meist aus Eiter isolierten Stämmen eine serologische Differenzierung mittels Agglutination vorzunehmen. Etwa ein Drittel der Stämme wurde spezifisch agglutiniert; um die restlichen zu klassifizieren, war es nötig, wenig spezifische Antikörper aus den Seren zu absorbieren. So konnten pathogene Staphylokokken in drei und saprophytische in zwei Gruppen unterteilt werden. Die Beurteilung der Pathogenität erfolgte auf Grund von Pigmentbildung und Mannitvergärung. Zur gleichen Zeit führte *Julianelle* (1922) ähnliche Untersuchungen

Eingegangen: 10. 4. 1958.

durch. Er konnte 25 Stämme in drei Gruppen differenzieren, wovon zwei je eine Untergruppe enthielten, die durch quantitative Unterschiede in gewissen Antigenkomponenten gekennzeichnet waren. Eine deutliche Korrelation zwischen dieser Einteilung und der Pathogenität, geprüft im Tierversuch oder auf Grund der Hämolysinbildung, ließ sich jedoch nicht feststellen. *Mellon* und *Caldwell* (1926) fanden nach Absorptionsexperimenten bei pigmentierten und unpigmentierten Staphylokokken gemeinsame und spezifische Antigene und bei Aureus-Stämmen außerdem verschiedene Typenantigene. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen *Hopkins* und *Barrie* (1928). Sie konnten eine Anzahl Stämme von *Staphylococcus aureus* in drei Gruppen einordnen, die die Antigene A, B und C in der Verteilung AB, B und BC enthielten. Diese Autoren hoben hervor, daß die Absorptionsexperimente nur unter qualitativ und quantitativ genau gleichen Bedingungen reproduzierbare Resultate gaben. *Yonemura* (1936) fand unter 324 Stämmen neun verschiedene Gruppen und vier Untergruppen. Weitauß die meisten hämolysierenden Staphylokokken verteilten sich auf drei Gruppen. *Blair* und *Hallmann* (1936) konnten, ebenfalls in Absorptionsexperimenten, drei Gruppen pathogener Staphylokokken unterscheiden. In einer viel beachteten Arbeit beschrieb *Cowan* (1939) eine Objektträgermethode zur agglutinatorischen Differenzierung pyogener Staphylokokken. Er fand, daß zur Herstellung spezifisch absorbierbarer Seren sich 18-stündige Kulturen am besten eigneten, während er zur Agglutination ganz junge, durch kurzes Kochen abgetötete Keime vorzog. Bei gewissen Stämmen ergaben sich unmittelbar nach der Isolierung oder nach einer Tierpassage etwas andere agglutinatorische Eigenschaften als nach Züchtung auf Nährböden. Es wurden ebenfalls drei Gruppen aufgestellt, in die etwa zwei Drittel der untersuchten Stämme ohne weiteres eingeordnet werden konnten. Die Gruppe III umfaßte Staphylokokken, die in zwei Seren agglutiniert wurden und meist weniger konstante Resultate gaben als die Vertreter der ersten beiden Gruppen. Eine größere Zahl von Stämmen konnte wegen atypischer oder inkonstanter Reaktionen nicht klassifiziert werden. Apathogene Staphylokokken reagierten mit keinem der verwendeten Seren. *Christie* und *Keogh* (1940) bedienten sich derselben Methode und fanden, daß eine Mischung von *Cowan's* Seren I und II alle koagulasepositiven, aber keine koagulase-negativen Staphylokokken menschlicher Herkunft agglutinierten.

Etwa ein Drittel der untersuchten Stämme wurde durch die absorbierten Seren I, II und III von *Cowan* nicht agglutiniert, und zu ihrer Klassifizierung mußten sechs weitere Seren herbeigezogen werden, so daß schließlich neun Gruppen, I—III und 4—9, aufgestellt wurden. In den neuen Gruppen figurierten hauptsächlich Stämme mit komplexer Antigenstruktur, die durch zwei oder mehr absorbierte Seren agglutiniert wurden und ihrer Herkunft nach in der Mehrzahl als Erreger menschlicher Krankheitsprozesse aufzufassen waren. In die Gruppen I—III fielen hauptsächlich Keime aus Nase, Hals oder Sputum gesunder Träger. Die Autoren betonten, daß einzelne Seren sich verschieden verhielten bei der Absorption. Die einen erforderten eine genaue Dosierung des Absorbens, während andere auch bei Behandlung mit einem Überschuß von Keimen ihre spezifischen Antikörper behielten. *Durfee* (1942) bestätigte ebenfalls die Einteilung *Cowan's* und die gelegentlich inkonstanten Reaktionen in Gruppe III. Um 110 Stämme, die meist aus menschlichen Krankheitsprozessen kamen, zu klassifizieren, war jedoch die Verwendung eines vierten Serums erforderlich. Basierend auf den Arbeiten von *Cowan* und von *Christie* und *Keogh* stellte *Hobbs* (1948) in einer ausgedehnten Untersuchung an 1552 Stämmen noch weitere Typen fest und kam zu einer Einteilung pathogener Staphylokokken in 5 Gruppen und 13 Untergruppen. Die Resultate der feineren Typendifferenzierungen waren jedoch nicht regelmäßig reproduzierbar.

In einer Serie von Arbeiten überprüften französische Autoren die bisherigen Ergebnisse. Sie verwendeten durch kurzes Kochen getötete Keime zur Immunisierung, Absorption und Agglutination. Die Individualität der Gruppen I—III von *Cowan* und 4—9 von *Christie* und *Keogh* konnte bestätigt werden (*Mercier, Pillet* und *Chabanier* 1950, *Pillet* und *Orta* 1953). Bei apathogenen Staphylokokken fanden sich, neben einem unspezifischen auch bei pathogenen vorkommenden Agglutinogen mehrere spezifische, die das Vorkommen vieler Typen annehmen ließen (*Pillet* und *Orta* 1954). Bei zahlreichen Absorptionsexperimenten unter quantitativ genau definierten Verhältnissen zeigte sich, daß die Eigenschaften der einzelnen Antigene, wie Stimulierung der Antikörperbildung im Kaninchen, Absorption entsprechender Antikörper aus heterologen Seren und Agglutination mit korrespondierenden Agglutininen, einander nicht parallel gingen und von Stamm zu Stamm verschieden waren, aber konstant bei Züchtung unter genau glei-

chen Bedingungen (*Pillet, Mercier und Orta* 1952). Nach Behandlung der zur Absorption verwendeten Kokken mit Papain ließen sich keine Antikörper mehr absorbieren, woraus auf die Proteinatur der entscheidenden Komponenten an der Kokkenoberfläche zu schließen war (*Pillet, Rouyer und Orta* 1955). *Andersen und Heilesen* (1951) unterschieden drei Arten von Antigenen bei pathogenen Staphylokokken auf Grund der Empfindlichkeit gegen Temperaturen von 120° C im Autoklaven und gegen Einwirkung von Trypsin. Unter den gegen beide Einflüsse empfindlichen Komponenten vermuteten die Autoren mehrere spezifische Antigene, die serologischen Reaktionen waren aber hier sehr inkonstant. Bei den hitzeresistenten Antigenen ließen sich serologisch drei Typen feststellen, die den Gruppen I—III von *Cowan* entsprachen. Unter den gegen Trypsin resistenten, aber hitzelabilen Faktoren fanden sich ein bei pyogenen Staphylokokken weit verbreitetes sowie zwei für gewisse Typen spezifische Antigene. *Oeding* (1952, 1953 b) verwendete in einer Reihe von Untersuchungen, im Gegensatz zu den meisten bisher zitierten Autoren, durch Formalin getötete Staphylokokkensuspensionen zur Immunisierung und lebende Keime zur Objektträgeragglutination. Durch Absorption konnte er neun spezifische Seren herstellen, die je einem bestimmten Faktor in der Antigenstruktur der untersuchten Staphylokokken entsprachen. Auf Grund von vier hitzelabilen Faktoren a, b, c, e konnten pathogene Staphylokokken in vier Gruppen, gekennzeichnet durch die Antigenkombinationen abe, ab, abc und abce, eingeteilt werden. Davon standen die ersten drei in Korrelation zu *Cowan's* Gruppen I—III. Unter Berücksichtigung weiterer meist hitzestabiler Antigene oder Antigenkomponenten konnten innerhalb dieser Gruppen mehrere, zum Teil gut definierte Typen unterschieden werden. Bei einigen von diesen ließen sich Beziehungen zu den früher von *Christie und Keogh* und von *Hobbs* definierten Gruppen 4—13 feststellen. Ein Serum mit Antikörpern gegen die Faktoren a und c erwies sich als zuverlässig für die Differenzierung von koagulasepositiven und koagulasenegativen Staphylokokken (*Oeding* 1953 a). Ein hitzestabiles Antigen d wurde bei allen pyogenen Stämmen gefunden.

Neben der Agglutination, die in der launischen Reaktionsfähigkeit der Kokkenoberfläche immer einen Unsicherheitsfaktor birgt und andererseits eine vollständige Aufklärung der Antigenstruktur nicht erlaubt, wurde oft auch die Präzipitationsmethode mit

Bakterienextrakten zur Differenzierung der Staphylokokken herbeigezogen. *Julianelle* und *Wiegard* (1934) isolierten durch wiederholte Behandlung mit Essigsäure und Alkohol aus pathogenen und apathogenen Staphylokokken je eine spezifische Substanz von Kohlehydratnatur. Präzipitation mit diesen Präparaten erfolgte nur mit Seren intravenös immunisierter Kaninchen und dann nur in einem Drittel bis einem Viertel der Fälle, während nach intrakutaner Immunisierung überhaupt keine Präzipitinbildung festzustellen war. Entsprechende Extrakte von ähnlicher Spezifität konnten nach einfachem Kochen mit Säure und anschließender Neutralisation aus pathogenen und apathogenen Staphylokokken gewonnen werden (*Julianelle* und *Wiegard* 1935). *Hoffstadt* und *Clark* (1935) erhielten nach eingehenden Extraktions- und Reinigungsprozeduren ebenfalls je ein Kohlehydrat aus gelben und weißen Staphylokokken. Das erste hatte die gleichen serologischen Eigenschaften wie die entsprechende Substanz von *Julianelle* und *Wiegard*. Das zweite wurde aber durch ein mit homologen apathogenen Staphylokokken hergestelltes Immunserum nicht präzipitiert. Beide enthielten im Gegensatz zu den Präparaten von *Julianelle* und *Wiegard* qualitativ weder Phosphor noch Stickstoff. Während *Hegemann* (1937) mit der Methode von *Julianelle* und *Wiegard* deren Ergebnisse bestätigen konnte, fanden *Thompson* und *Khorazo* (1937) bei der Untersuchung von 286 Staphylokokkenstämmen, allerdings unter Verwendung eines einfachen säurelöslichen Extraktes, neben den Antigenen A und B eine dritte Substanz C. Eine Anzahl von Stämmen enthielt sowohl den Faktor B als auch den Faktor C. Fast ein Drittel der untersuchten Staphylokokken lieferte kein Extrakt, das in einem der verwendeten Seren präzipitiert wurde. 90% der pathogenen Stämme gehörten zu *Julianelle's* Gruppe A. *Cowan* (1938) extrahierte Staphylokokkensuspensionen durch Kochen oder Behandlung im Autoklaven. Es traten aber hie und da unspezifische Präzipitationen auf, so daß es nötig war, die Seren zu absorbieren. Aus der Prüfung von 157 Stämmen ergab sich eine Einteilung in vier Gruppen. In Gruppe A waren die meisten pathogenen Staphylokokken vereint, während Gruppe C eine kleinere Zahl solcher Stämme umfaßte. In die Gruppen B und D fielen apathogene Keime. Zwischen 10 und 15% der untersuchten Stämme konnten nicht klassifiziert werden. Zur Herstellung brauchbarer präzipitierender Seren waren mit einigen Stämmen

mehrere Monate dauernde Immunisierungsprozeduren nötig. Verwey (1940) kam bei Verwendung einfacher säurelöslicher Extrakte zu den gleichen Ergebnissen wie Thompson und Khorazo, nach differenzierten Fraktionierungsexperimenten konnte er jedoch eine weitere spezifische Substanz feststellen, die parallel mit dem Faktor A von *Julianelle* und *Wieghard* auftrat und auf Grund physikalischer und chemischer Eigenschaften als Protein aufzufassen war. Oeding (1954 b, 1955) konnte nach Extraktion eines pyogenen Stammes im Autoklaven zwei Polysaccharidfraktionen isolieren. Beide waren schwache Antigene. Eine entsprach dem Gruppenpolysaccharid A von *Julianelle* und *Wieghard*, während die andere als typenspezifische Substanz aufgefaßt wurde.

Da für die Untersuchung einer größeren Zahl von Stämmen die Herstellung von Extrakten sehr zeitraubend ist, wurde auch versucht, Filtrate von Bouillonkulturen zu Präzipitationsreaktionen zu verwenden. So fand Geiße (1914) bei der Unterscheidung pathogener und apathogener Stämme eine gewisse Parallelität zwischen Agglutination und dieser Methode der Präzipitation. Hudson (1923) und Dudgeon und Simpson (1928) andererseits erhielten starke Kreuzreaktionen und konnten so eine Differenzierung von Staphylokokken nicht vornehmen. Die Herstellung genügend stark präzipitierender Seren gelang nicht durchwegs und zudem kann nach Day (1928) angenommen werden, daß bei länger dauernder Autolyse für die Präzipitationsreaktion verantwortliche Substanzen fermentativ zerstört werden. Burky (1933) immunisierte Kaninchen mit Kulturfiltrat toxinbildender Staphylokokken und fand in den so erhaltenen Seren dem Antitoxingehalt nicht parallel gehende Präzipitine gegen Kulturflüssigkeit pathogener, nicht aber apathogener Stämme. Er faßte die entsprechenden Präzipitinogene als Substanzen auf, die unter der Staphylokokkenwirkung aus Bouillonbestandteilen gebildet wurden. *Julianelle* und *Wieghard* (1935) stellten, allerdings bei einer geringen Zahl von Stämmen, eine gute Übereinstimmung fest zwischen den Präzipitationsreaktionen mit Kulturfiltraten einerseits und gereinigten Kohlehydratfraktionen andererseits.

Vor kurzem unternahmen Stern und Elek (1957) mit zum Teil neueren Methoden eine Untersuchung der Antigenstruktur der Typenstämme I, II und III von Cowan. Die Agglutination ganzer Zellen und isolierter Zellwände in den dazugehörigen Seren ergab im Wesentlichen gleiche Resultate, nämlich stets deutlich

höhere Titer im homologen Versuch, so daß angenommen werden konnte, allfällige Gruppenantigene seien auch in den isolierten Zellwänden enthalten. Nach *Lancefield* mit Salzsäure extrahierte Polysaccharide aus ganzen Zellen und isolierten Zellwänden zeigten keine Gruppenspezifität. Bei der Prüfung mit der Agardiffusionsmethode enthielten alle diese Präparate ein und dasselbe Antigen. Die Untersuchung von isoliertem Endoplasma mit Endoplasmaseren ergab bei der Präzipitation ebenfalls keine Gruppenspezifität, und im Agardiffusionsversuch enthielt jedes Präparat mindestens sechs Antigene, unter denen gemeinsame sowie gruppenspezifische vermutet werden konnten. Durch Immunisierung mit ganzen Zellen hergestellte Seren wurden mit zunehmenden Mengen der beiden heterologen Keime absorbiert, um so ein qualitatives und quantitatives Bild von der Antigenkonstellation an der Zelloberfläche zu bekommen. Unter der Voraussetzung, daß der Titer eines Serums gegen einen bestimmten Stamm beim Vorliegen mehrerer korrespondierender Antigen-Antikörpersysteme durch das quantitativ am stärksten vertretene Agglutinin bestimmt wird und ein Maß für den entsprechenden Antigengehalt an der Oberfläche des untersuchten Stammes darstellt, sowie mit der Annahme nur spezifischer Absorption entwarfen die Autoren ein Antigenchema für die drei Gruppen von *Cowan*. Es wurden drei in verschiedener Quantität in allen drei Gruppen vorhandene Hauptantigene, ein spezifisches Nebenantigen für jede Gruppe und zwei jeweils bei zwei Gruppen vorkommende Nebenantigene postuliert.

Diese Literaturübersicht zeigt, daß die Staphylokokken eine sehr komplizierte Antigenstruktur haben. Immerhin wurde von mehreren Autoren mit ganz verschiedenen Methoden bei den meisten pathogenen Staphylokokken ein spezifisches Kohlehydrat gefunden, das ein Bestandteil der Zellwand sein dürfte. Eine entsprechende Substanz ist bei saprophytischen Staphylokokken vorhanden. Nach Untersuchungen von *Oeding* (1953b) sind bei pathogenen Staphylokokken noch weitere gruppen- und typenspezifische hitzestabile Antigene anzunehmen. An der Zelloberfläche von pyogenen und saprophytischen Kokken scheinen mehrere serologisch unterscheidbare, zum Teil sehr labile Proteine von ganz verschiedener Spezifität vorzukommen. Nach *Rogers* (1956) kann man annehmen, daß ein großer Teil der Produktion extrazellulärer Fermente an der Zelloberfläche der Kokken statt-

findet. Bei der Milieuabhängigkeit dieser Aktivität (Lack 1956, Rogers 1956) wäre somit eine Variabilität der Oberflächenstruktur nicht erstaunlich. Von verschiedener Seite wurde außerdem auf das Vorkommen gemeinsamer Proteine bei allen Staphylokokken hingewiesen.

Eigene Untersuchungen.

Während des Jahres 1956 wurde auf den Wochenbettstationen des Frauenspitals Basel gehäuftes Auftreten von Mastitis puerperalis festgestellt. Um einen Einblick in die epidemiologischen Verhältnisse zu bekommen, wurde versucht, die aus Abszeßteiler und bei Umgebungsuntersuchungen isolierten Staphylokokken mit einer serologischen Methode zu typisieren. Dieses Ziel konnte nicht erreicht werden. Es ergaben sich aber im Laufe dieser Arbeit zur Untersuchungstechnik und zur Antigenstruktur der Staphylokokken einige Gesichtspunkte, die hier festgehalten sein sollen.

Material und Methoden: Staphylokokken: Im Ganzen wurden 256 Stämme untersucht. Sie kamen zum größten Teil aus dem Frauenspital Basel und wurden isoliert aus Mastitiseiter, Pyodermien, infizierten Operationswunden und Hautabstrichen von Patientinnen, aus Nasen- und Rachenabstrichen von Patientinnen, Neugeborenen, Ärzten und Krankenschwestern sowie aus Luft und Bodestaub der Wöchnerinnen-Zimmer¹. Zu Vergleichszwecken wurden 51 Stämme anderer Herkunft, die im Untersuchungsamt des Hygienischen Institutes isoliert worden waren, dem übrigen Material beigegeben. Von den gesammelten Proben wurden ab Blutagarplatten mit Einzelkolonien Schrägagarröhrchen beimpft, mit Aluminiumkappen verschlossen, 18 Stunden bei 37°C inkubiert und dann bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Überimpfungen wurden alle zwei bis drei Monate vorgenommen.

Pathogenitätsteste: Alle Stämme wurden auf die Fähigkeit, Mannit zu vergären sowie auf Pigment-, Koagulase- und Phosphataseproduktion untersucht. Die Beurteilung der Pathogenität stützte sich auf die Resultate der Koagulase- und Phosphataseprobe. Die beiden Reaktionen zeigten in 99% der Fälle Übereinstimmung.

Die Koagulaseprobe wurde im Prinzip nach der Methode von Fisk (1940) durchgeführt. An Stelle von frischem Plasma wurden jedoch Trockenkonserven verwendet (vergl. Fey, 1951).

Zur Prüfung der Phosphataseaktivität (Barber und Kuper, 1951; Stähelin, 1952) wurde gewöhnliche Nährbouillon mit einem Gehalt von 0,006% Phenolphthaleinphosphat-Natrium verwendet. Zu 5 ccm dieses Substrates wurden mit

¹ Herrn Prof. Koller, Direktor des Frauenspitals Basel, sei an dieser Stelle für sein freundliches Entgegenkommen bestens gedankt sowie den Assistenten der Klinik für die Entnahme und Zusendung des Untersuchungsmaterials.

einer Kapillarpipette fünf Tropfen einer 18stündigen Bouillonkultur des zu untersuchenden Stammes gegeben. Nach Inkubation für 24 Stunden bei 37°C wurde durch Zugabe eines Tropfens Lauge das Vorhandensein freien Phenolphthaleins festgestellt.

Resistenzprüfungen: Alle Stämme wurden auf ihre Empfindlichkeit gegen Penicillin, Streptomycin, Tetracyclin und Chloromycetin geprüft mit der Filterscheibchenmethode (Sebas-Test) der Firma *Wild*, Basel. Die Beurteilung der Resultate geschah unter Vergleich mit Durchschnittswerten aus der Prüfung von 10 empfindlichen Stämmen, die aus Nasenabstrichen gesunder, nicht im Kontakt mit einem Spitalmilieu stehender Personen isoliert worden waren. Als unterste Grenze der Empfindlichkeit ergaben sich so folgende Durchmesser der Hemmungshöfe: Penicillin 40 mm, Streptomycin 27 mm, Tetracyclin 29 mm und Chloromycetin 33 mm. Außer beim Streptomycin entstanden keine Schwierigkeiten der Beurteilung, da im Falle einer Resistenz stets ein deutlicher Unterschied gegenüber dem Vergleichswert festzustellen war.

Serologische Untersuchungen.

In einigen Vorversuchen wurde das Wachstum koagulasepositiver Staphylokokken in gewöhnlicher Nährbouillon (0,3% Fleischextrakt, 0,5% Pepton, 0,2% NaCl, 0,3% KH_2PO_4) und CCY-Bouillon nach *Gladstone* und *Fildes* (1940) einerseits und in stehenden Kulturen im Brutschrank und Schüttelkulturen im Wasserbad andererseits verglichen. Intensität und Homogenität des Wachstums sowie Resuspendierbarkeit nach Zentrifugieren waren bei verschiedenen Bebrütungszeiten in Schüttelkulturen mit CCY-Bouillon am besten. Alle im Weiteren verwendeten Kulturen wurden nach folgendem Verfahren gezüchtet: 23 ccm CCY-Bouillon in Röhrchen von der Gestalt eines umgekehrten T wurden mit drei Tropfen einer gewöhnlichen Bouillonkultur beimpft, mit Wattestopfen verschlossen und im Wasserbad von 37°C geschüttelt nach der von *van Heyningen* und *Gladstone* (1953) angegebenen Methode.

Herstellung von Antiseren: Zur Herstellung von Immunseren wurden vier Mastitisstämme ausgewählt, bei denen auf Grund der Resistenzprüfung und nach epidemiologischen Gesichtspunkten verschiedene serologische Eigenschaften vermutet werden konnten. Die Stämme M 164, resistent gegen Penicillin, M 158, resistent gegen Penicillin und Streptomycin, und M 32, resistent gegen Penicillin, Streptomycin und Tetracyclin wurden von Patientinnen isoliert, bei denen nach Entbindung im Frauenspital eine Mastitis aufgetreten war. Stamm M 137, resistent gegen Penicillin, Streptomycin und Tetracyclin, wurde aus Mastitiseiter einer Frau gezüchtet, die im Ausland geboren hatte und nach Auftreten der Infektion hier in Behandlung war. Zu Vergleichszwecken wurden Seren gegen zwei weitere Stämme aus ganz anderen Quellen hergestellt. Stamm 22, resistent gegen Penicillin, Streptomycin, Tetracyclin und Chloromycetin kam von einem anderen Spital aus einem infizierten Clavus. Stamm L 9, empfindlich gegen alle geprüften Antibiotica, wurde vom Nasenabstrich einer gesunden Person isoliert, die keinen Kontakt mit einem klinischen Milieu gehabt hatte. Zur Vakzinebereitung wurden diese sechs Stämme nach der oben erwähnten Methode bei 8stündiger Inkubation gezüchtet. Nach Zentrifugieren und Abgießen des Überstandes wurden die Keime zur Abtötung

in 0,5% Formalin-NaCl-Lösung zum ursprünglichen Volumen aufgeschwemmt und für 10 Stunden in den Brutschrank gestellt. Darauf wurden sie dreimal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, die Wachstumsdichte durch vergleichende Trübungsmessung im *Klett-Summerson-Kolorimeter* bestimmt und in physiologischer NaCl-Lösung eine Suspension hergestellt, die in 0,5 ccm die zur Immunisierung gewünschte Keimmenge enthielt. Um möglichst hohe Titer für Agglutinations- und Präzipitationsreaktionen zu bekommen, wurde versucht, die Antikörperproduktion durch Verwendung von Adjuvans nach der Methode von *Freund et al.* (1948) zu intensivieren. Als Adjuvans wurde Paraffinum perliquidum Ph. H. V. (0,25—0,3 Poisen) und als Emulgator Span 80 der Firma *Walter Mösch & Co.*, Zürich, verwendet. Die beiden Substanzen wurden getrennt im Autoklaven sterilisiert. Darauf wurden im Paraffinöl abgetötete, getrocknete Tuberkelbazillen suspendiert in solcher Menge, daß pro Injektionsdosis etwa 4 mg Bakterientrockensubstanz entfielen. Sechs Teilen dieser Suspension wurde ein Teil Span 80 beigegeben. 2 ccm dieser öligen Mischung und 0,5 ccm dichte wäßrige Staphylokokkensuspension wurden nun mit Hilfe eines hochfrequenten Rührapparates zu einer homogenen Emulsion verarbeitet. Mit jedem der sechs ausgewählten Stämme wurde ein Kaninchen von 2500 bis 3500 g Körpergewicht durch zwei Injektionen im Abstand einer Woche immunisiert. Die Vakzine enthielt beim ersten Mal 3×10^{10} und beim zweiten Mal 7×10^{10} Keime, jeweils in einem Gesamtvolumen von 2,5 ccm, und wurde subkutan hinter den Schulterblättern in zwei Portionen links und rechts der Wirbelsäule appliziert.

Vier bis sechs Wochen nach Versuchsbeginn traten bei der Hälfte der Kaninchen an den Injektionsstellen pflaumen- bis mandarinengroße sterile Abszesse auf (vgl. *Ehrich et al.* 1945). Das Körpergewicht blieb bei allen Tieren bis zum Entbluten konstant. Vier, sieben und acht Wochen nach der ersten Vakzineinjektion wurde Blut aus der Ohrvene zur Titerbestimmung entnommen. In der neunten Woche wurden die Kaninchen aus der A. carotis entblutet. Das Serum wurde durch Seitzfiltration sterilisiert und mit 0,1% Methiolatzusatz bei 4°C aufbewahrt. Die Agglutinintiter gegen die homologen Stämme zu den erwähnten Zeitpunkten unter Verwendung lebender Keime als Antigen sind in Tabelle I zusammengefaßt. Da mit jedem Stamm nur ein Kaninchen immunisiert worden war, war die Ursache der relativ hohen

TABELLE I.

Agglutinintiter gegenüber homologen Staphylokokkenstämmen nach Immunisierung mit dem Freundschens Adjuvans.

Serum	vor Behandlung	5. Woche	7. Woche	8. Woche	9. Woche
M 164	2	640	3 200	3 200	12 800
M 158	4	320	1 600	3 200	3 200
M 32	1	160	800	3 200	12 800
M 137	2	1 280	1 600	6 400	25 600
22	2	1 280	1 600	6 400	6 400
L 9	4	1 280	1 600	3 200	3 200

Die Titer sind als reziproke Werte der größten noch wirksamen Serumverdünnung angegeben.

Titerunterschiede nicht zu eruieren. Es fiel jedoch auf, daß am wenigsten Agglutinine von jenen Tieren gebildet wurden, bei denen die erwähnten sterilen Abszesse entstanden waren. Mangels vergleichender Untersuchungen kann nicht entschieden werden, ob die Verwendung von Adjuvans die Antikörperbildung gegen Staphylokokken verbessert hat. Die erzielten Titer sind jedoch im Durchschnitt nicht höher als jene, die von anderen Autoren mit dem üblichen Vorgehen erreicht wurden (Hopkins und Barrie, 1928; Stern und Elek, 1957).

Agglutinationsreaktionen: Zuerst wurde versucht in Analogie zum Vorgehen von Oeding (1952) mittelst Absorption und Objektträgeragglutination einzelne Faktoren in der Antigenzusammensetzung der verwendeten Stämme zu differenzieren.

Herstellung von Antigen: 4stündige CCY-Bouillon-Schüttelkulturen wurden zentrifugiert und in 2—3 ccm physiologischer NaCl-Lösung zu einer Dichte von ca. 1×10^9 Keimen pro ccm suspendiert.

Absorption der Seren: In Zentrifugenröhrchen von 9 mm lichter Weite und etwa 5 ccm Volumen wurde 1 ccm 1 : 10 in physiologischer NaCl-Lösung verdünntes Serum zu steigenden Mengen ($1,5 \times 10^9$ bis $1,5 \times 10^{12}$) durch Formalin getöteter Keime gegeben, und mit der Oese eine homogene Suspension hergestellt. Die Röhrchen wurden sodann mit Gummistopfen gut verschlossen und 60 Minuten im Wasserbad von 37°C unter ständigem Schaukeln, wie es für die Herstellung der Kulturen angegeben wurde, inkubiert. Anschließend wurden die Keime abzentrifugiert, und mit den absorbierten Seren geometrische Verdünnungsreihen in physiologischer NaCl-Lösung hergestellt.

Objektträgeragglutination: Mit Kapillarpipetten wurden ein Tropfen Serumverdünnung und ein Tropfen Staphylokokkensuspension auf eine entfettete Uhrglasschale gebracht, mit der Öse gemischt und während fünf Minuten langsam kreisförmig bewegt. Die Reaktion wurde mit einer Lupe bei schräg einfallendem Licht gegen dunklen Hintergrund abgelesen. Physiologische NaCl-Lösung und ein unspezifisches Serum dienten als Kontrollen.

Nach zahlreichen Absorptions- und Agglutinationsexperimenten zeigten sich gewisse Unterschiede in der Antigenzusammensetzung der geprüften Stämme, die Resultate waren jedoch inkonstant, und es erwies sich bald als unmöglich, mit dieser Methode unter den gegebenen Umständen in nützlicher Frist zum Ziel zu kommen.

Präzipitationsreaktionen: 16stündige CCY-Bouillon-Schüttelkulturen ($2,2$ bis $3,2 \times 10^9$ Keime pro cc) wurden 30 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abpipetiert und nach Verdünnung mit dem doppelten Volumen physiologischer NaCl-Lösung in Kapillarröhrchen auf Serum überschichtet. Nach Inkubation bei Zimmertemperatur für 15, 30 und 60

Minuten wurde die Reaktion als Ringtest abgelesen. Bei Prüfung jedes Stammes gegen jedes Serum zeigte sich überall etwa gleich starke Präzipitation. Es wurde deshalb versucht, in Analogie zu den Agglutinationsreaktionen, durch Absorption der Seren spezifische Resultate zu erhalten. Im Wesentlichen wurde nach der oben beschriebenen Weise vorgegangen. In einigen orientierenden Versuchen erwiesen sich bei 65° C abgetötete Keime aus 16-stündigen Kulturen am günstigsten als Absorbens. Es zeigte sich, daß bei der zur Absorption nötigen Verdünnung der Seren die Schichtgrenzen in den Kapillarröhrchen bald unscharf wurden. Zur Erhöhung der Dichte wurde deshalb der physiologischen NaCl-Lösung Rinderalbumin (Bovine Plasma Albumin, Fraction V, Armour Laboratories, Sussex, England) in der Konzentration von 5 g% beigegeben. Die Seren wurden zur Absorption 1 : 5 mit dieser Lösung verdünnt. Damit blieben die Schichten in den Kapillarröhrchen für mehrere Stunden getrennt. Kontrollen zwischen unimpfter CCY-Bouillon und den absorbierten Seren sowie zwischen Kulturflüssigkeit der untersuchten Stämme und unspezifischem, in Albuminlösung verdünntem Kaninchenserum waren immer negativ.

In einer Serie von Experimenten wurde unter anderem jedes Serum mit jedem Stamm absorbiert und auf spezifische Präzipitine gegen die Kulturflüssigkeit aller sechs Stämme geprüft. Die Resultate waren oft widersprechend, insbesondere bestand keine Relation zwischen der Eigenschaft der ganzen Zellen eines Stammes als Absorbens und der entsprechenden Kulturflüssigkeit als Antigen. Schließlich konnten auf Grund wiederholter Prüfungen mit identischen Reagentien vier Antigenkomponenten festgestellt werden. Die Faktoren x, y und z durften als mehr oder weniger spezifisch gelten, da sie nicht bei allen Stämmen nachweisbar waren. Das Serum M 137 präzipitierte unabhängig von der Art und — von einem gewissen Minimum an — auch unabhängig von der Menge der zur Absorption verwendeten heterologen Keime regelmäßig nur die Kulturflüssigkeit des homologen Stammes. Die übrigen fünf Seren wurden durch starke Absorption vollständig erschöpft, bei mäßiger blieben Präzipitine gegen einzelne Stämme zurück, so daß es nahelag, bei ihnen gemeinsame Antigene in verschiedener Verteilung anzunehmen. Mit dem Buchstaben w wurde die Gesamtheit jener Antigene bezeichnet, die in nicht absorbierten Seren die starken unspezifischen Reaktionen

verursachten. Die Verteilung dieser Faktoren bei den sechs Teststämmen sowie bei sechs weiteren pathogenen Stämmen aus dem übrigen Untersuchungsmaterial ist in Tabelle II zusammengefaßt.

TABELLE II.

Verteilung der Antigenfaktoren in der Kulturflüssigkeit von verschiedenen Staphylokokkenstämmen.

Antigen Faktor	Teststämme						Weitere Stämme					
	M 164	M 158	M 32	M 137	22	L 9	M 161	M 201	F 12 N	F 50 N	F 1 R	F 1 N
Z	—	—	—	++++	—	—	—	+	++++	++++	—	—
Y	—	+	+++	++	—	+++	—	—	—	++++	++	—
X	++++	+++	++++	++	+++	—	—	+++	—	—	+++	+
W	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Die Zeichen + + + +, + + +, + + und + geben die Stärke der Reaktion an, beurteilt nach dem Zeitpunkt des Auftretens und nach der Intensität des Präzipitationsringes. Die Tabelle zeigt, daß die Faktoren x, y und z in dieser Reihenfolge mit abnehmender Häufigkeit nachweisbar sind. Daß die Präzipitation in den verschiedenen Seren nicht nur auf quantitativen Unterschieden im Antigengehalt der Kulturflüssigkeit einzelner Stämme beruht, wird klar, wenn man beachtet, daß in gewissen Fällen ein wenig verbreiteter Faktor nachweisbar ist, während ein sonst häufig vorkommender fehlt.

Resultate der Untersuchungen an 256 koagulasepositiven und koagulasenegativen Stämmen aus dem Frauenspital Basel und aus verschiedenen anderen Quellen:

Zur Abklärung der Frage, ob die gefundenen serologischen Eigenschaften der untersuchten Stämme die Aufstellung verschiedener Gruppen oder Typen und somit eine epidemiologische Auswertung erlauben, wurden die Ergebnisse der Resistenzprüfungen und der Präzipitationsreaktionen von koagulasepositiven Staphylokokken verschiedener Herkunft verglichen (Tabelle III). Bei 44 von 47 im Frauenspital aufgetretenen Wochenbettinfektionen mit Staphylokokken sind resistente Keime isoliert worden. Von den bei Umgebungsuntersuchungen gefundenen pathogenen Staphylokokken wurden deshalb meist auch nur die resistenten für die serologische Untersuchung aufbewahrt. Dies muß bei der Beurteilung der Tabelle III berücksichtigt werden. Man sieht, daß die Wochenbettinfektionen (42mal Mastitis, 3mal Furunkulosis und 1mal purulente Rhinitis bei Müttern, 1mal Mastitis beim Neu-

TABELLE III.

Resistenz gegenüber Antibioticis und Verteilung der Antigenfaktoren bei koagulasepositiven Staphylokokken von verschiedener epidemiologischer Abstammung.

I			II			III		
Antibio- tica- resistenz	Zahl	Sero- logische Faktoren	Antibio- tica- resistenz	Zahl	Sero- logische Faktoren	Antibio- tica- resistenz	Zahl	Sero- logische Faktoren
⊖	3	ZYXW	⊖	(41)	ZYXW	⊖	13	ZYXW
		YXW			YXW			YXW
		XW			XW			XW
		W			W			W
		Z W			Z W			Z W
		Y W			Y W			Y W
		ZY W			ZY W			ZY W
P	16	Z XW	P	58	Z XW	P	6	Z XW
		—			—			—
		YXW			YXW			YXW
		XW			XW			XW
		W			W			W
		Z W			Z W			Z W
		Y W			Y W			Y W
PS	25	ZY W	PS	25	ZY W	PS	4	ZY W
		Z XW			Z XW			Z XW
		—			—			—
		ZYXW			ZYXW			ZYXW
		YXW			YXW			YXW
		XW			XW			XW
		W			W			W
PST	3	Z W	PST	14	Z W	PST	16	Z W
		Y W			Y W			Y W
		ZY W			ZY W			ZY W
		Z XW			Z XW			Z XW
		—			—			—
		ZYXW			ZYXW			ZYXW
		YXW			YXW			YXW
Übrige: PSTC PT ST T S PTC	0	XW	Übrige: PSTC PT ST T S PTC	8	XW	Übrige: PSTC PT ST T S PTC	8	XW
		W			W			W
		Z W			Z W			Z W
		Y W			Y W			Y W
		ZY W			ZY W			ZY W
		Z XW			Z XW			Z XW
		—			—			—
Total	47	ZYXW	Total	107 (146)	ZYXW	Total	47	ZYXW
		YXW			YXW			YXW
		XW			XW			XW
		W			W			W
		Z W			Z W			Z W
		Y W			Y W			Y W
		ZY W			ZY W			ZY W
		Z XW			Z XW			Z XW
		—			—			—
		ZYXW			ZYXW			ZYXW
		YXW			YXW			YXW
		XW			XW			XW
		W			W			W
		Z W			Z W			Z W
		Y W			Y W			Y W
		ZY W			ZY W			ZY W
		Z XW			Z XW			Z XW
		—			—			—
		ZYXW			ZYXW			ZYXW
		YXW			YXW			YXW
		XW			XW			XW
		W			W			W
		Z W			Z W			Z W
		Y W			Y W			Y W
		ZY W			ZY W			ZY W
		Z XW			Z XW			Z XW
		—			—			—
		ZYXW			ZYXW			ZYXW

I = Coag. + Staph. aus Wochenbettinfektionen im Frauenspital.

II = Coag. + Staph. aus Umgebungsuntersuchung im Frauenspital.

III = Coag. + Staph. aus verschiedenen anderen Quellen.

P = Penicillin, S = Streptomycin, T = Tetracyclin (Achromycin), C = Chloromycetin (Chloramphenicol).

geborenen) hauptsächlich durch penicillin- und penicillin-streptomycinresistente Staphylokokken mit den Antigenkombinationen xyw und xw verursacht wurden. Unter den bei Umgebungsuntersuchungen isolierten Stämmen findet sich eine etwas andere Verteilung der Typen, insbesondere was die Resistenzen betrifft. Noch verschiedener ist das Bild bei Staphylokokken aus ganz anderen Quellen. Man kann also annehmen, daß für die beschriebenen Infektionen einige Typen von Staphylokokken hauptsächlich verantwortlich sind. Für diese müßten sich nun bei einer epidemiologischen Abklärung bestimmte Infektketten feststellen lassen mit zeitlichen und örtlichen Beziehungen zwischen der Infektion und dem Auftreten der entsprechenden Keime in der Umgebung. Stämme mit Resistenz gegen Penicillin und Penicillin-Streptomycin und den Antigenkombinationen yxw und xw konnten aus Abstrichen der oberen Luftwege des Spitalpersonals, aus Nasenabstrichen von Säuglingen sowie aus Luft und Staub und anderen Quellen isoliert werden. Die epidemiologische Bedeutung der erhobenen serologischen Befunde wird aber in Frage gestellt durch die Resultate der Untersuchungen an koagulase negativen Staphylokokken. Auch bei diesen waren nämlich die Faktoren z, y, x und w, wenn auch in anderem Verhältnis als bei pathogenen Keimen, nachweisbar. Diese Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengefaßt. Man sieht, daß die angewendete Methode für eine Unterscheidung von pathogenen und apathogenen Staphylokokken und somit auch für eine epidemiologische Untersuchung nicht geeignet ist. Keiner der vier Faktoren tritt in den beiden Gruppen in

TABELLE IV.
*Serologische Typen der koagulasepositiven und -negativen
Staphylokokkenstämme.*

Serologische Faktoren	Coag. + Staph. Zahl	%	Coag. - Staph. Zahl	%
ZYXW	34	16	0	
YXW	41	19	5	12
XW	61	29	10	23
W	43	20	22	51
Z W	9	4	3	7
Y W	5	2	1	2
ZY W	12	6	0	
Z XW	8	4	2	5
Total	213	100	43	100

irgendeiner Weise spezifisch auf. Das Antigen oder die Antigengruppe w findet sich bei allen untersuchten Stämmen. Das Antigen z konnte bei pathogenen Keimen in 30% und bei apathogenen in 12%, die Antigene y und x in 43% bzw. 14% und 68% bzw. 40% nachgewiesen werden.

Diskussion.

Für die vorliegende epidemiologische Untersuchung wegen gehäuften Auftretens von Mastitis puerperalis im Frauenspital Basel wurden ursprünglich 457 Staphylokokkenstämme isoliert. 195 waren koagulasepositiv und von diesen zeigten 149 (76%) Resistenz gegen eines oder mehrere der geprüften Antibiotica. Es stellt sich die Frage, ob auf Grund der Resistenz gegen verschiedene Kombinationen von Antibiotica nicht schon ein Einblick in die epidemiologischen Verhältnisse zu gewinnen wäre. Die weite Verbreitung resistenter Staphylokokken in den Spitälern und der unvermeidliche Austausch solcher Keime zwischen den einzelnen Kliniken einer Stadt durch Personal und Patienten dürfte jedoch eine sichere Abklärung von Infektketten kaum erlauben. Außerdem haben Untersuchungen mit Bakteriophagen und serologische Typisierungen gezeigt, daß die Fähigkeit zur Resistenzbildung nicht auf gewisse Gruppen von Staphylokokken beschränkt ist (*Rountree und Thomson, 1949; Pillet, Calmels, Orta, Chabanier, 1954; Isbister, Durie, Rountree, Freeman, 1954; Oeding, 1954 a*). Es wurde deshalb versucht, mit einer serologischen Methode eine Einteilung des Untersuchungsmaterials vorzunehmen. Präzipitationsreaktionen mit Kulturflüssigkeit von Staphylokokken wurden bis jetzt hauptsächlich zur Unterscheidung von pathogenen und apathogenen Keimen durchgeführt. Die Resultate waren nicht durchwegs befriedigend. Da ein Teil der bei starkem Wachstum durch Autolyse in die Kulturflüssigkeit übergehenden Substanzen gruppen- oder typenspezifisch sein könnte, wurde hier versucht, durch Absorption der Immunseren zu einer Differenzierung einzelner Stämme zu kommen. Die spezifischen Antigene der Staphylokokken liegen größtenteils an der Bakterienoberfläche, wie aus vielen Untersuchungen mit der Agglutinationsreaktion hervorgeht. Bei Absorption der Seren mit ganzen Zellen sollte deshalb die Isolierung von Antikörpern gegen einzelne Faktoren möglich sein. Da die hier durchgeführten Absorptionsexperimente gezeigt haben, daß Antikörper gegen Substanzen in der Kulturflüssigkeit

bei der Absorption durch die Zelloberfläche gebunden werden, andererseits aber keinen spezifischen Charakter haben, bleibt die Natur der entsprechenden Antigene unklar, insbesondere da auch ihre chemischen Eigenschaften nicht untersucht wurden. *Julianne* und *Wieghard* (1935) haben bei pathogenen und apathogenen Staphylokokken gemeinsame speziesspezifische Proteine gefunden. Daß mindestens ein gemeinsames Agglutinin vorkommt, geht aus Untersuchungen von *Pillet* und *Orta* (1954) hervor. *Rogers* (1956) stellte fest, daß in Kulturflüssigkeit von Staphylokokken neben α -Toxin, Koagulase und Hyaluronidase weitere Proteine vorkommen, deren Bedeutung noch unklar ist. *Stern* und *Elek* (1957) haben im Endoplasma pathogener Staphylokokken meist sechs Antigene gefunden, über deren Spezifität noch nichts bekannt ist. Bei den hier beschriebenen Antigenkomponenten z, y, x und w könnte es sich also um Bestandteile solcher bei pathogenen und apathogenen Staphylokokken vorkommender Substanzen handeln.

Zusammenfassung.

Mit zwei Injektionen einer nach der Freund'schen Adjuvantentechnik hergestellten Staphylokokkensuspension lassen sich gute agglutinierende und präzipitierende Immunseren produzieren. Mit absorbierten Immunseren konnten in der Kulturflüssigkeit mittels Präzipitation vier Antigenfaktoren nachgewiesen werden. Die Typenverteilung der Faktoren ergab bei der Untersuchung von 256 Stämmen keine scharfe Trennung der pathogenen und apathogenen Stämme. Es konnten gewisse Unterschiede in der prozentualen Typenverteilung zwischen Staphylokokken aus einer Mastitis puerperalis-Epidemie und solchen aus anderen Quellen festgestellt werden.

Résumé.

Deux injections d'une suspension de staphylocoques préparée d'après la technique des adjuvants de Freund ont permis d'obtenir de bons antisera agglutinants et précipitants. A l'aide des sera absorbés, quatre facteurs antigéniques ont été mis en évidence par précipitation dans le liquide de culture. La typisation selon ces facteurs de 256 souches n'a pas révélé de nettes distinctions entre les germes pathogènes et apathogènes. Entre les souches d'une épidémie de mastites puerpérales et les souches d'autres origines, certaines différences de pourcentage de types ont été trouvées.

Summary.

With two injections of a staphylococcal suspension prepared according to Freund's adjuvant technique it is possible to produce good agglutinating and precipitating immune sera. With absorbed immune sera four antigenic factors could be shown in the culture fluid by means of precipitation. Investigating 256 strains the type-distribution of factors gave no sharp division of pathogenic and nonpathogenic strains. Certain differences in the percentile type-distribution were revealed between staphylococci isolated from an epidemic of puerperal mastitis and those from other sources.

Literatur.

- Altmann, K. und Blühdorn, C.: Komplementbindung bei Staphylokokken und Sarcinen. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 57: 87-96 (1911).
- Andersen, E. K. and Heilesen, B.: On the occurrence and typing of *Staphylococcus pyogenes* in weeping eczema and the rôle played by these bacteria in the pathogenesis and course of eczema. Acta dermat.-venereol. (Stockholm) 31: 679-703 (1951).
- Barber, M. and Kuper, S. W. A.: Identification of *Staphylococcus pyogenes* by the phosphatase reaction. J. Path. Bact. 63: 65-68 (1951).
- Blair, J. E. and Hallmann, F. A.: Serologic grouping of *Staphylococci*. J. Bact. 31: 81-82 (1936).
- Bøe, J.: On the distinction between pathogenic and non-pathogenic *Staphylococci*. Acta path. microbiol. scand. 21: 721-730 (1944).
- Burky, E. L.: Studies on cultures and broth filtrates of *Staphylococci*. IV. Antitoxin content of rabbit serums immune to *Staphylococcus* toxin and the precipitin reactions of such serums. J. Immunol. 25: 419-437 (1933).
- Christie, R. and Keogh, E. V.: Physiological and serological characteristics of *staphylococci* of human origin. J. Path. Bact. 51: 189-197 (1940).
- Cowan, S. T.: The classification of *staphylococci* by precipitation and biological reactions. J. Path. Bact. 46: 31-45 (1938).
- Classification of *staphylococci* by slide agglutination. J. Path. Bact. 48: 169-173 (1939).
- Day, H. B.: Preparation of antigenic specific substance from *Staphylococcus pyogenes aureus*. Brit. J. exp. Path. 9: 198-206 (1928).
- Dudgeon, L. S. and Simpson, J. W. H.: Differentiation of *Staphylococci* with special reference to precipitin reactions. J. Hyg. (London) 27: 160-173 (1928).
- Durfee, O.: Classification of 110 strains of *Staphylococcus aureus*. J. Bact. 44: 589-595 (1942).
- Ehrich, W. E.; Halbert, S. P.; Mertens, E. and Mudd, S.: Mechanism of the augmenting action of mineral oil on antibody production. J. exp. Med. 82: 343-360 (1945).
- Fey, H.: Über die Eignung menschlichen Trockenplasmas für die Koagulase-Reaktion pathogener *Staphylokokken* und den Einfluß verschiedener Antibiotica auf die Koagulase. Schweiz. Arch. Tierheilk. 93: 375-389 (1951).

- Fisk, A.*: The technique of the coagulase test for Staphylococci. *Brit. J. exp. Path.* 21: 311-314 (1940).
- Freund, J.; Thomson, K. J.; Hough, H. B.; Sommer, H. E. and Pisani, T. R.*: Antibody formation and sensitization with the aid of adjuvants. *J. Immunol.* 60: 383-398 (1948).
- Geisse, A.*: Die Differenzierung pathogener und saprophytischer Staphylokokken. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 76: 282-306 (1914).
- Gladstone, G. P. and Fildes, P.*: A simple culture medium for general use without meat extract or peptone. *Brit. J. exp. Path.* 21: 161-173 (1940).
- Hegemann, G.*: Untersuchungen über Typendifferenzierung der Staphylokokken. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 140: 108-112 (1937).
- van Heyningen, W. E. and Gladstone, G. P.*: The neurotoxin of *Shigella shigae*, the effect of iron on production of the toxin. *Brit. J. exp. Path.* 34: 221-229 (1953).
- Hine, T. G. M.*: Serological classification of the staphylococci. *Lancet II*, 1380 to 1382 (1922).
- Hobbs, B. C.*: Study of serological type differentiation of *Staphylococcus pyogenes*. *J. Hyg. (London)* 46: 222-236 (1948).
- Hoffstadt, R. E. and Clark, W. M.*: Studies on the antigenic structure of the variants of *Staphylococcus aureus*. The carbohydrates of the rough and smooth forms of *Staphylococcus aureus*. *J. infect. Dis* 56: 250-254 (1935).
- Hopkins, J. G. and Barrie, N.*: Antigenic relationships of certain strains of *Staphylococcus aureus* as shown by agglutinin absorption. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* 25: 701-702 (1928).
- Hudson, P.*: The incidence and classification of Staphylococci in the throats of normal persons and of persons with common colds. *J. infect. Dis.* 32: 297-306 (1923).
- Isbister, C.; Durie, E. B.; Rountree, P. M. and Freeman, B. M.*: A further study of Staphylococcal infection of the newborn. *Med. J. Austr.* 41/II: 897-900 (1954).
- Julianelle, L. A.*: Studies of hemolytic Staphylococci. *J. infect. Dis.* 31: 256-284 (1922).
- Julianelle, L. A. and Wieghard, C. W.*: Immunological specificity of carbohydrates derived from Staphylococci. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* 31: 947 to 949 (1934).
- Immunological specificity of Staphylococci. III. Interrelationships of cell constituents. *J. exp. Med.* 62: 31-37 (1935).
- Klein, A.*: Über die Bedeutung der Agglutination für die Diagnose der saprophytischen und pathogenen Staphylokokken. *Zbl. Bakt. I. Abt. Ref.* 51: 660-661 (1912).
- Klopfstock und Bockenheimer*: Beitrag zur Agglutination der Staphylokokken. *Arb. a. d. chir. Klin. d. k. Univ., Berlin* 1904.
- Kolle, W. und Otto, R.*: Die Differenzierung der Staphylokokken mittelst Agglutination. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 41: 369-379 (1902).
- Kutscher und Konrich, F.*: Untersuchungen über die Beziehungen von Hämolysebildung und Agglutinabilität der Staphylokokken. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 48: 249-268 (1904).

- Lack, C. H.: Biological characteristics of Staphylococci that may relate to virulence; biological characteristics of Staphylococci recovered from pathologic materials. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 65: 103-108 (1956).
- Mellon, R. R. and Caldwell, D. W.: Studies in microbic heredity. *J. Bact.* 12: 409-426 (1926).
- Mercier, P.; Pillet, J. et Chabanier, P.: Détermination des types de staphylocoques par l'agglutination. *Ann. Inst. Pasteur* 78: 457-466 (1950).
- Oeding, P.: Serological typing of Staphylococci. *Acta path. microbiol. scand. Supplm.* 93: 356-365 (1952).
- A simple serological procedure for the differentiation between pyogenic and saprophytic staphylococci. *Acta path. microbiol. scand.* 32: 187-192 (1953 a).
- Serological typing of Staphylococci II. Investigations on the serological, chemical and physical properties of the antigens. *Acta path. microbiol. scand.* 33: 312-323 (1953 b).
- Staphylococcal studies in hospital staffs. IV. Serological Investigation. *Acta path. microbiol. scand.* 34: 34-46 (1954 a).
- Immunochemical studies of staphylococcal polysaccharides. 1. Methods for extraction and purification. *Acta path. microbiol. scand.* 35: 484-494 (1954 b).
- Immunochemical studies of staphylococcal polysaccharides. 2. The immunological properties of autoclaved extracts. *Acta path. microbiol. scand.* 37: 116-120 (1955).
- Otto, R.: Weitere Beiträge zur Agglutination der Staphylokokken. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 34: 44-48 (1903).
- Pillet, J.; Calmels, J.; Orta, B. et Chabanier, G.: Etude comparée du type sérologique, de la sensibilité aux bactériophages et de l'antibiogramme de 201 souches des staphylocoques isolés par prélèvement systématiques chez le nourrisson. *Ann. Inst. Pasteur* 86: 309-319 (1954).
- Pillet, J.; Mercier, P. et Orta, B.: Recherches sur les agglutinines hétérologues des sérums antistaphylocoques. Utilisation d'une méthode d'absorption quantitative. *Ann. Inst. Pasteur* 82: 465-470 (1952).
- Pillet, J. et Orta, B.: Recherches sur les agglutinines hétérologues des sérums antistaphylococciques. Etude de l'agglutination par les sérums bruts. *Ann. Inst. Pasteur* 82: 488-492 (1952).
- Pillet, J. et Orta, B.: Recherches sur les agglutinines hétérologues des sérums antistaphylococciques. Etude de la spécificité des types 4, 5, 6, 7, 8, 9. *Ann. Inst. Pasteur* 84: 420-426 (1953).
- Pillet, J. et Orta, B.: Recherches sur la composition antigénique des staphylocoques non pathogènes. Mise en évidence d'agglutinogènes spécifiques et d'un agglutinogène commun aux souches pathogènes et non pathogènes. *Ann. Inst. Pasteur* 86: 752-758 (1954).
- Pillet, J.; Rouyer, M. et Orta, B.: Recherches sur la nature chimique des agglutinogènes staphylococciques. *Ann. Inst. Pasteur* 88: 662-665 (1955).
- Pröschner: Über die künstliche Immunität gegen Staphylokokken. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 34: 437-445 (1903).
- Rogers, H. J.: The formation of extracellular enzymes by staphylococci. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 65: 132-138 (1956).

- Rountree, P. M. and Thomson, E. F.:* Incidence of Penicillin-resistant and Streptomycin-resistant Staphylococci in a hospital. *Lancet* 257: 501-504 (1949).
- Stähelin, H.:* Die Phosphataseproduktion der Staphylokokken und ihre Beziehung zur Pathogenität. *Schweiz. Z. allg. Path.* 15: 526-532 (1952).
- Stern, H. and Elek, S. D.:* Antigenic structure of *Staphylococcus pyogenes*. *J. Path. Bact.* 73: 473-483 (1957).
- Thompson, R. and Khorazo, D.:* Correlated antigenic and biochemical properties of Staphylococci. *J. Bact.* 34: 69-79 (1937).
- Veiel, F.:* Die Staphylokokken des chronischen Ekzems. *Münch. med. Wschr.* 51/I: 13-16 (1904).
- Verwey, W. F.:* Type-specific antigenic protein derived from the *Staphylococcus*. *J. exp. Med.* 71: 635-644 (1940).
- Wiegand, C. W. and Julianelle, L. A.:* The immunological specificity of staphylococci. The chemical nature of the soluble specific substances. *J. exp. Med.* 62: 23-30 (1935).
- Yonemura, N.:* Über die immunisatorische Einteilung von *Staphylokokkus pyogenes*. *Z. Immun. Forsch.* 89: 392-397 (1936).
-